

内合22-66

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文審査報告書

論 文 題 目

単一フィラメント顕微直視による
アクチン重合・脱重合ダイナミクスの研究
A study on the Polymerization-depolymerization
dynamics of actin by direct observation of
single filaments

申 請 者

藤原 郁子
IKUKO FUJIWARA

物理学及
応用物理学

実験生物物理学

2003年 03月

アクチンは、筋細胞に限らず真核生物のあらゆる細胞に存在する普遍的なタンパク質であり、細胞骨格を構成する最も重要なタンパク質の一つである。従って、その重合・脱重合機構は、細胞のダイナミックな機能にとって本質的に重要な役目を担っている。細胞中においては、キャップタンパク質や切断タンパク質、枝化タンパク質、そして Ca^{2+} 結合能をもつ様々な調節タンパク質系の働きによって、アクチンの重合・脱重合ダイナミクスは時間的・空間的に制御されている。従来、らせん構造を持つアクチンフィラメントの重合・脱重合ダイナミクスの研究は、溶液系を用いて行われてきた。その結果、重合過程は気液凝縮過程に似て、核形成過程と成長過程からなることが明らかになった。本研究は、それを1分子レベルで観察し解析することで、アクチン重合・脱重合ダイナミクスの新しい側面を明らかにしようとしたものである。

第1章では、本研究の意義と背景、概要が述べられている。

第2章では、本研究で用いた実験系と実験方法が述べられている。直径7 nmのアクチンフィラメントを蛍光顕微鏡で可視化するために、アクチンの Cys374 に蛍光色素(tetramethyl-rhodamine-5-maleimide)が標識された。装置系として、ガラス面から約150nm程度しか励起光の届かないエバネッセント場照明法を用いた全反射蛍光顕微鏡装置を組み立てた。アクチンは臨界濃度以上で初めて重合するが、そのような高いタンパク質濃度では背景光が蛍光ノイズとなってしまう、従来の蛍光顕微鏡法ではフィラメントを直視することができない。この新しい照明法によって、フィラメント安定化因子ファロイジン（臨界濃度を殆どゼロにする）を添加しなくてもフィラメントの直視が可能となり、重合過程のみならず、脱重合過程をも捉えることが可能になった。

第3章では、モノマーアクチンからフィラメントへの重合過程を、全反射蛍光顕微鏡装置を用いて実時間直視・解析した結果について述べられている。30mM KCl, 2mM MgCl_2 主体の塩溶液にモノマーアクチンを加えたところ、アクチンは単調に重合し、重合相を経て定常相に至った。顕微鏡下で観察を開始（塩添加後約6分）してから1分毎のアクチンフィラメントの長さ変化を約30分間観察した。アクチンの重合速度は、モノマーアクチン濃度が高くなるにつれて増加した。重合相において、アクチン濃度 $0.3\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $0.7\mu\text{M}$ の平均の重合速度は、それぞれ $0.13 \pm 0.36\mu\text{m}/\text{min}$ 、 $0.35 \pm 0.38\mu\text{m}/\text{min}$ 、 $0.49 \pm 0.46\mu\text{m}/\text{min}$ であった。この値をもとに見積った重合速度定数は $k^+ = 6.1/\mu\text{M}/\text{s}$ 、脱重合速度定数は $k^- = 0.85/\text{s}$ 、臨界濃度は $C_c = 0.14\mu\text{M}$ となり、溶液系の結果とよく一致した。特筆すべきことは、世界に先駆けて1本のアクチンフィラメント上でのトレッドミル過程を確認できたことである。トレッドミルとは、定常相で発生する現象である。フィラメント全体では一定長を保っているが、B端で重合し、P端で脱重合するため、フィラメントは常に新しいアクチンに交換されるという現象である。これまでは、フィラメント安定化因子ファロイジンの影響によって脱重合過程を見ることが出来なかつ

た。本研究では、10%ラベルという低い濃度で蛍光標識することにより、フィラメント上に出来る蛍光ムラを目印として利用し、目印からフィラメントの両端までの長さの変化を計測した。その結果、B 端では定常相においてもゆっくりと重合し続け(平均 $0.069 \pm 0.037 \mu\text{m}/\text{min}$)、P 端ではそれと見合う速度でゆっくりと脱重合(平均 $-0.062 \pm 0.051 \mu\text{m}/\text{min}$)していることが確認できた。さらに、アクチンフィラメントの長さは重合相においても定常相においても常に揺らいでいた。この長さ揺らぎが単なる計測誤差なのか、それとも何らかのアクチン重合・脱重合ダイナミクスを表すものなのかを検討するため、計測の時間間隔 τ を変え、1 分、2 分、3 分というそれぞれの τ におけるフィラメント長の変化を計測した。定常相におけるアクチンフィラメントの長さ変化の平均は、 τ に関わらずゼロだったが、長さ変化の大きさを示す長さ揺らぎ(S.D.)は τ とともに増加した。言い換えれば、アクチンフィラメントの総量は変化しないが、1 本のフィラメントの長さは常に変化していることを示す。 $(\text{S.D.})^2$ を τ に対してプロットしたところ、直線近似することができた。このことは、アクチンフィラメントの長さ揺らぎがランダムな拡散過程に従っていることを示している。こうして、近似直線の傾きからモノマーアクチン 1 個の重合速度定数・脱重合速度定数を見積もったところ、重合相から得られた値よりも約 40 倍程度大きかった。このことは、平均約 6 個のアクチンサブユニットが、まとまって重合・脱重合に関与しているとする理解できる。以上より、定常相では、平均 6 個のアクチンサブユニットが重合・脱重合過程に関与してトレッドミルが生じていること、すなわち、微小管と比べて穏やかではあるが、動的不安定性が生じていることが明らかになった。

第 4 章では、アクチン調節タンパク質 Arp2/3 Complex と VCA 存在下で、アクチンフィラメントの枝化形成がどのように行われるかを直視・解析した結果がまとめられている。調節タンパク質の一つである Arp2/3 Complex は膜結合タンパク質の一部である VCA によって活性化され、運動性細胞の先端周辺部における素早いアクチン重合にとって重要であると言われているが、Arp2/3 Complex がアクチンを枝化させる機構は明らかになっていなかった。そこで、申請者はアクチンフィラメントの枝化形成過程を直視するとともに、光ピンセット法を用いた一分子破断力計測を行った。その結果、フィラメントの途中からの枝化が大半の約 72% を占めた。また B 端部からの枝化は 12% であり、他の種類の枝化も確認できた。枝形成箇所から B 端までの距離 (ΔB) を y 軸にとり、P 端までの距離 (ΔP) を x 軸にとった 2 次元マップから、申請者はフィラメント上における枝の形成されやすい箇所について解析することが出来た。更に、2 次元マップを Mother filament の全長(= $\Delta B + \Delta P$)で区分けし投影したところ、重合の初期段階で、まず B 端からの枝化が起こり、引き続いてフィラメントの途中からの枝化が生じることが示された。更に、重合しながら枝化するタイプ(成長型)だけでなく、フィラメント同士が直接結合する枝化(結合型)も発見された。結合型の枝化がファロイジ

ンを添加しても抑制されなかったことから、成長型の枝化形成にはアクチンモノマーが必要だが、結合型の枝化形成にはアクチンモノマーは必要ないことが示された。また、光ピンセットによって外部負荷を加えた実験から、ガラス面上に結合している VCA を介した Arp2/3 Complex とアクチンフィラメントの結合と解離を観測でき、Arp2/3 Complex がアクチンフィラメントの途中に結合することを直接証明することが出来た。以上の解析結果を元に、枝化機構を提案した。1)アクチンフィラメントの B 端に Arp2/3 Complex が結合した時には、Mother filament のみならず、速やかに Daughter filament が伸長する。2)アクチンフィラメントの途中に結合した時には、Daughter filament はすぐには伸長せず、B 端からの枝化より遅れて伸長する。3)VCA と Arp2/3 Complex の平均の結合時間は、約 100 秒である。以上より、異なる枝化タイプによる空間的にも時間的にも異なった制御機構を、生体内に近い状況下で解明することが出来た。

第 5 章では、本論文の研究成果が箇条書きとしてまとめられ、将来の展望が簡潔に述べられている。

以上で述べたように、本申請者はアクチンフィラメントという真核細胞に普遍的に存在する細胞骨格の重合・脱重合ダイナミクスを、エパネッセント場照明法（全反射蛍光顕微鏡法）を駆使することによって単一フィラメントレベルで解析することに世界に先駆けて成功し、トレッドミル機構を直接証明しただけでなく、フィラメント両端での長さ揺らぎの解析に基づいて、アクチン 1 分子の単純な結合・解離のダイナミクスでは説明できない重合・脱重合過程の存在を示唆した。さらに同じ手法を用いて、アクチン結合タンパク質 Arp2/3 Complex と VCA 共存下でのアクチン重合過程を観測し、フィラメントの枝化形成機構について、フィラメント途中からの枝化とフィラメント端での枝化とを区別することに成功し、さらにフィラメント同士の直接結合による枝化形成という新しい枝化形成機構を発見した。このように、申請者の研究成果は、アクチンフィラメント重合・脱重合機構における最も本質的な性質を明らかにしたものである。さらに、アクチン調節タンパク質の枝化機能を実時間解析したことによって、ここで用いられた手法が今後ともアクチンフィラメント重合・脱重合ダイナミクス研究の基礎となりうることを示したものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

2003 年 2 月

審査員	主査	早稲田大学理工学部教授	理学博士（名古屋大学）	石渡 信一
		早稲田大学理工学部教授	理学博士（名古屋大学）	浅井 博
		早稲田大学理工学部教授		千葉 明夫
		早稲田大学理工学部教授	理学博士（早稲田大学）	船津 高志